

① 日本国特許庁(JP)

② 特許出願公表

③ 公表特許公報(A)

昭63-503242

④ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑤ 公表 昭和63年(1988)11月24日

G 01 N 33/58

A-8305-2G

審査請求 未請求

部門(区分) 6(1)

C 12 Q 1/68

A-6807-4B

予備審査請求 未請求

G 04 D 1/70

6807-4B

G 09 F 7/00

6781-2F

G 09 F 3/03

D-6810-5C

(全11頁)

⑥ 発明の名称 真偽を立証したい物品の標識

⑦ 特 願 昭62-502252

⑧ 翻訳文提出日 昭62(1987)12月9日

⑨ 出 願 昭62(1987)4月9日

⑩ 国際出願 PCT/CB87/00242

⑪ 国際公開番号 WO87/06383

⑫ 国際公開日 昭62(1987)10月22日

優先権主張

⑬ 1986年4月9日 ⑭ イギリス(GB) ⑮ 8608529

⑯ 発 明 者

リ・ページ、リチャード・ウィ

イギリス国、ケンブリッジ・シー・ビー・2・1・テイ・エイ、ゴ

リアム・フアラ

ンビル・アンド・カイウス・カレッジ(書地なし)

⑰ 発 明 者

スレイター、ジエイムズ・ハワ

イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・エス・アール、リ

ード

ズベイン、ホウル・ワイ・テイリン・38

⑱ 出 願 人

バイオタル・リミテッド

イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・デー・エル、チ

ルターン・クロウズ・5

⑲ 代 理 人

弁理士 川口 義雄 外2名

⑳ 指 定 国

A T (広域特許), A U, B E (広域特許), C H (広域特許), D E (広域特許), D K, F I, F R (広域特許), G B, C B (広域特許), I T (広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), N O, S E (広域特許), U S

要 求 の 範 囲

1. 真偽を立証したい物品または物質の標識方法であって、所定の巨大分子の第一化合物(シグナル化合物)を用いてこの第一化合物の正体を明らかにすることなく物品または物質を照照し、この第一化合物には同様の第二化合物が結合し得、その結果第一化合物の存在を明らかにし、したがって物品または物質が本物であることを立証できるようにしていることを特徴とする方法。

2. シグナル化合物を直接物品もしくは物質中に組み込むか、シグナル化合物を物品もしくは物質に付着せしめるか、シグナル化合物を含んでいる材料を物品もしくは物質に接着適用するか、またはシグナル化合物を物品もしくは物質の内部中に含ませることによって、照照を遂行する、請求の範囲1に記載の方法。

3. シグナル化合物が付着しているタグを用いて物品を照照する、請求の範囲1に記載の方法。

4. タグを、直接物品に取り付けるか、物品の構造の一部として物品中に直接組み込むか、またはその他のやり方で物品に結合する、請求の範囲3に記載の方法。

5. 巨大分子の形態にあるシグナル化合物を用いて物品または物質を照照する、請求の範囲1に記載の方法。

6. 照照もしくはカビ菌の菌子の形態またはウイルスの形態にあるシグナル化合物を用いて物品または物質を照照する、請求の範囲1に記載の方法。

7. シグナル化合物が核酸である、請求の範囲1に記載の方法。

8. 核酸がDNAである、請求の範囲7に記載の方法。

9. DNAが、特異的DNAプローブとハイブリダイズし得る1個以上のシグナル配列を含んでいる、請求の範囲8に記載の方法。

10. 前記DNAを他のDNAと融合する、請求の範囲8に記載の方法。

11. DNAが、微生物のゲノムDNAまたは制限エンドヌクレアゼによるその部分断片化に由来するDNAである、請求の範囲8に記載の方法。

12. DNAがプラスミドの形態にある、請求の範囲8に記載の方法。

13. DNAが合成DNAである、請求の範囲8に記載の方法。

14. 各々が別々の標識を占めている一連の異なるシグナル化

化合物を準備する、請求の範囲1に記載の方法。

15. 一連の別々の領域の第一のシグナル化合物を準備する、請求の範囲1に記載の方法。

16. 原料品、医薬品およびその他の化学製品、フィルムおよびレコード、銀行券、美術工芸品、証券類ならびに機会および部品から選択された品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

17. その標識品物または物質がシグナル化合物で標識されているかどうかを、第一の化合物の存在を明らかにできるように相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果品物または物質が本物であることを確かめることをさらに含む、請求の範囲1に記載の方法。

18. 品物または物質の真偽を決定するための方法であって、

(i) 品物または物質が特定の最大分子の第一化合物（「シグナル化合物」）によって標識されているかどうかを、第一の化合物の存在を明らかにできるようにこの第一の化合物に結合することができる相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果、

(ii) 品物または物質が本物であることを決定することを特徴とする方法。

明 細 書

偽造を否定したい物品の標識

本発明は物品の真偽を立証する(to authenticate)ための物品の標識(ラベル付け)に係る。

現代の世界は多くの領域で真偽の立証に関する重要な問題に直面している。製造業界であられるような大量生産された製品にしても富裕の世界であられるような展示にしても、これらは混乱を引起し、かつ真の所有者にとっては収益の損失を招く。産業の発達した国々内での世界貿易に関しては真偽標識の行為によって何兆ものドルが失われると推定されている。時計、電気製品、ハイファッションの衣類などのような一旗で高価の高い物品の製造業者にとっては事は特に重大である。生産国または外国での偽造品の販売は産業界にとって商取引上の主要な紛争である。明らかに、高価の低価格の製品もまた真偽と詐欺的販売の対象になる。

さらに、個人、法人、公共団体および政府が真偽の判断以外の理由で本物の品物を標識したいと思うのには多くの理由がある。たとえば、ある物品または品物(アイテム)の歴史的な

19. シグナル化合物の存在を検出する、請求の範囲18に記載の方法。

20. シグナル化合物に結合することができる標識された装置プローブを、品物または物質が本物である場合にシグナル化合物が占めている領域に接触させ、このプローブがこの領域で第一の化合物とハイブリダイズするかどうかを判定する、請求の範囲18に記載の方法。

21. プローブがDNAプローブである、請求の範囲20に記載の方法。

22. 装置の、品物または物質のラベルとしての用途。

の価値を可能にするように製造・販売網(ネットワーク)に於いた本物の品物の流れを追跡記録(モニター)するためである。これによってある特定の製造ネットワークの他と比べた場合に異なる特徴が認められるであろう。そしてこの場合明らかに真偽に対して対応する必要はほとんどない。しかしこの原理は、品物を一般的に、そして製造された品物の明白な同定を可能にするシステムによって標識する場合もやはり同じである。

それ自体標識されることがなく、したがって製造された真の品物を保護するのに採用されることのない完全に安全な監視システムを得るためにいろいろな作動モードに運用することができ、システムに対するニーズがある。そのようなシステムを通常の作動条件下で用いると本物の物品の取引と真偽をモニター・制御・調節することができ、しかも製造業者と消費者の双方をある程度保護することになる。次の3つの主要な保護機能を達成するように設計された完全に安全なシステムに対するニーズがある。

(a) ある品物のコピー(複製)品を製造・販売する権利をもちたいコピー業者による、コピーされた真の品物の詐欺的販売から真の製造業者を保護すること。

(b) コピーされた真の真偽品の故意または偶発的な販売からそ

れに提供できない複製を保護すること。

(c) 政府および公衆への適当な政府複製が、個別にしろ大量生産にしろ提供された複製物の複製を過度に制限・調節・制御・取締り・かつ経過する間に及ぼすこと。

このたび、物品の真偽を立証する問題に対する新しいアプローチが提供された。本発明においては2つの重要な事実を考慮する。まず第一に、簡単な化学分析手段によってDNAまたはタンパク質自体のような分子の、存在または不存在を検出する能力を利用する。このような手段は、DNA（または別の巨大分子）が存在するか否かを示すプラス/マイナス試験である。真なる結果、すなわち真なる生体由来するいろいろなDNA分子間に区別はない。しかし、このシステムの分解能は2段階の事実、すなわち核酸やタンパク質のような化合物の全配列または複製断片がもっている、一般的に認識され、したがってある物品が本物であることを明らかにする能力を利用することによってかなり改善することができる。

したがって本発明は真偽を立証したい品物または物質を複製する方法を提供する。この方法は品物または物質を所定の巨大分子からなる第一の化合物によって複製することからなるがこの第一の化合物の同一性（複製）を複製（複製）すること

とが可能になったのである。本発明はタグ（目印）による本物の物品の認可された複製に依存しうる。このタグは、たとえば、このタグ（したがってこのタグが付けられている品物または物質）の真偽がこのタグの制作者（生産者、デザイナー）によってのみ決定できるように、形、形、およびタイプで1種類以上のシグナル化合物を保持している。

あらゆる物質または品物（物品）を複製することができる。本発明の複製は時計、香水および衣服のような装飾品、医薬品ならびにその他の肥料、農薬および殺虫剤のような化学品、フィルムおよびレコード、旅行券、美術工芸品、パスポートのような証明書、さらに自動車部品のような機械・部品類などに適用しうる。

複製はさまざまな方法で実施することができる。たとえば品物または物質の製造中にその中へ複製シグナル化合物を入れてもよい。あるいは、接着剤などによってシグナル化合物を付着させてもよい。この接着剤がシグナル化合物からなっていないてもよい。またシグナル化合物は、品物または物質に塗布される塗料またはインクのような材料中に含まれてもよい。品物または物質の内容物がシグナル化合物を含んでいてもよい。

シグナル化合物が付いているタグを用いて物品を複製しても

とはしない。この第一の化合物には複製的または第二の化合物が結合することができ、その結果第一の化合物の存在を明らかにでき、したがって品物または物質が本物であることを立証できる。

本発明はまた、品物または物質の真偽を立証・確認するための方法を提供する。この方法は、

- 1) 所定の巨大分子からなる第一の化合物の存在または不存在が真偽とされ得るように第一の化合物に結合することができ、複製的または第二の化合物を用いて、品物または物質が前記第一の化合物によって複製されているか否かを決定し、それにより、
- 11) 品物または物質の本物であることを決定することからなる。

複製上ここでは第一の化合物をシグナル化合物とする。このシグナル化合物は、たとえば核酸の場合は核酸の、タンパク質の場合はアミノ酸の配列からなり得、この配列には複製的または第二の化合物が結合する。ここではこの配列をシグナル配列とする。

したがって、今や、各々が本物として一般的にしか所定の複製の複製法をもって複製され得るように複製を複製される品物もしくは物質または品物群もしくは物質群を複製すること

よい。このシグナル化合物は通常なプラスチックシートによって保護しておいてもよい。このタグは物品に直接付着していてもよい、物品の構造の一部として取込まれていてもよい。あるいは、このタグをその他の方法で物品と結び付けてもよい。たとえば、物品が包装されている箱の中に置く入れてもよい、または物品に付着する複製の面に貼られていてもよい。あるいは、物品の複製は、たとえば紙などではシグナル化合物を直接付着してもよい。

シグナル化合物は、このシグナル化合物の存在を検出を可能にするように複製的または第二の化合物が結合することができる化合物である。シグナル化合物は核酸やタンパク質のような巨大分子である。そのような巨大分子の形態のシグナル化合物、すなわち核酸の巨大分子を用いて品物または物質を複製してもよい。この巨大分子は合成品でもよいし、天然物から得られたものであってもよい。したがってDNAの場合、ゲノムDNAまたはその制限エンドヌクレアーゼによる部分断片化によって得られるDNAを使用することができる。

しかしながら別法として、複製としての使用条件に耐え得る分子またはその複製体の耐久使用の形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を複製してもよい。DNAおよび

(ある種のウィルスの場合の) RNA では、シグナル化合物は生体のゲノム全体またはその一部でよい。したがって、特にウィルス、細菌およびカビのような微生物を標的として使用することができよう。これらは少量で、しかし測定可能な量で使用し得る。菌子の例は、S. subtilis、S. cerevisiaeもしくはS. uvarumのようなBacillusの属またはPenicilliumもしくはAspergillusのようなカビの種の菌子である。これらの場合DNAやRNAは再繁殖することができる生体系の中に含有され、そのDNAがRNAを測定することになるであろう。菌子DNAたとえばサケ菌子DNA (Sigma 1-1501) もシグナル化合物として使用できる。

各々が別々の領域を占める一連のいろいろなシグナル化合物を提供し得る。あるいは、別々の領域の一連の同じシグナル化合物を提供してもよい。この場合、いろいろな第二の組織的化合物を使用して各組織のシグナル化合物のいろいろなシグナル配列と結合させることができる。これは特にシグナル化合物が組織である場合に適用される。シグナル化合物は核酸、DNAまたはRNAが好ましい。

簡単にいえば標的の目的には単に巨大分子の存在または不在を検出するだけで十分であろう。すなわち、ある種の目的に

達することによって異なる種のDNAおよび同じ種の異なる種のDNAを区別することが可能である。当該生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNAの断片からなる複製に標識されたプローブを使用することができ、合成DNAプローブを使用してもよく、同時にH-15プローブ標識物のようなバクテリオファグプローブも使用し得る。また、プラスミドプローブを使用することができる。このプローブDNAは異なるDNA分子内に含有されているからしめ合い複合DNA配列とハイブリダイズすることができる。

したがって本発明においては、産物または物質がシグナルDNAで標識される。このシグナルDNAは特定のプローブDNAとハイブリダイズすることができる配列を含んでいる。この配列がシグナル配列である。シグナルDNAとプローブDNAとの双方が標識されている。標識されている産物または物質をプローブDNAを用いて分析した結果シグナルDNAのシグナル配列が認められた場合、この産物または物質は本発明である。そうでなければその産物または物質は本発明ではない。このプローブDNAはもちろん、ハイブリダイゼーションが生じたかどうかを判断するように、たとえば放射能もしくは酵素ラベルによって、ビオチニル化(biotinylation)によって、または光

は、標的分子としての、または生体系の一部としてのDNAの存在を決定すれば十分であろう。DNAの存在を検出するには、エチウムプロミド、アクリクアオレンジまたはビス-ベンズイミド(H33258, Hoechst dye 33258)のような非特異的にDNAに結合する化学薬品を使用することができる。エチウムプロミドの結合はDNAとエチウムプロミドとを共に提供することによって達成し得る。これらの存在はその検出外縁によって検出することができる。これによって簡単な標識方法が得られるが、高い程度の感度性は得られず、したがって高い安全性も得られない。それはプラス/マイナス試験である。

各種、さらに種内の各種に別するDNAの独自性、即ち特定のDNA分子を迅速、一時的かつ正確に区別することに関する技術的水準と相俟って、有生物と無生物とのあらゆる区別であらゆる種類の産品を、標識された物品と区別し得るようになすことのできる標識となる。これによって、簡単なプラス/マイナス試験より複雑な標識された形の標識が可能になる。

生体の各種についてDNAまたはRNAの分子は独特である。同じ種の異なる個体は標識の配列における小さな変化によって異なっている。たとえば、標識したDNAプローブでDNAを検

出することによって異なる種のDNAおよび同じ種の異なる個体のDNAを区別することが可能である。当該生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNAの断片からなる複製に標識されたプローブを使用することができ、合成DNAプローブを使用してもよく、同時にH-15プローブ標識物のようなバクテリオファグプローブも使用し得る。また、プラスミドプローブを使用することができる。このプローブDNAは異なるDNA分子内に含有されているからしめ合い複合DNA配列とハイブリダイズすることができる。

したがって本発明においては、産物または物質がシグナルDNAで標識される。このシグナルDNAは特定のプローブDNAとハイブリダイズすることができる配列を含んでいる。この配列がシグナル配列である。シグナルDNAとプローブDNAとの双方が標識されている。標識されている産物または物質をプローブDNAを用いて分析した結果シグナルDNAのシグナル配列が認められた場合、この産物または物質は本発明である。そうでなければその産物または物質は本発明ではない。このプローブDNAはもちろん、ハイブリダイゼーションが生じたかどうかを判断するように、たとえば放射能もしくは酵素ラベルによって、ビオチニル化(biotinylation)によって、または光ビオチニル化(photobiotinylation)によって標識されている。シグナルDNAは1種以上の異なるシグナル配列を含んでいてもよい。すなわち、同一のタグに対して所与のDNAシグナル分子を別個に区別使用して個々の特定のDNAプローブのいずれかを使用しただけに依りて異なるシグナルを得ることができよう。シグナル配列が反復して存在しているのが好ましい。これによってプローブDNAに対するシグナル配列の感度が向上する。シグナルDNAは微生物のゲノムDNAであるのが好ましいが、簡単な系では、合成して得られるような短いDNA配列を使用することもできる。ウィルスまたは遺伝子のゲノムDNAを使用してもよく、同時にゲノムDNAを制限エンドヌクレアゼで部分消化したものも使用できる。プラスミドも使用できる。

シグナルDNAのシグナル配列は、これとハイブリダイズすることができるプローブの入手容易性によってあらかじめ定められた配列とすることができる。それはDNA分子に固有の配列でもよい。あるいはまた、DNA分子の中に特別に導入してもよいし、DNA分子と重合してもよい。シグナル配列のサイズはプローブDNAに対する検出可能な応答を引き出せるようなものとすべきである。取扱いの理由から1-10kbpのシグナル配列が適当である。

シグナルDNAで標識された品物または物質が本物であるという確信がさまざまな程度で得られる。信頼性の程度はシグナルDNAを2個以上用いることによって向上することができる。品物または物質は、別々の領域が各々異なるシグナルDNAによって標識されていてもよい。シグナルDNAは別のDNAと混合して適用してもよい。これをここでは連鎖DNAと称する。この連鎖DNAが存在すると、シグナルDNAの正確なシグナル配列を決定しようとしている人の仕事は簡単になる。

本発明は以下のようにして適用される。一連の異なる微生物を調製し増殖させる。各々の微生物に対してゲノムDNAを抽出し、個別的な分子生物学の技術を用い、特定の制限エンドヌクレアゼで消化して生成したゲノムDNAの短い配列をランダムにクローニングすることによって一連のいろいろなプローブを製造する。これによって、当該DNAを得ることができる微生物種のDNAをハイブリダイゼーションによって認識するプローブが生成する。したがってプローブDNAは、厳密的にシグナルDNAのみが所有しているはずのシグナル配列を定める。

一般的なプローブが異なる種のDNAとハイブリダイズすることはありそうもないが、これは異なる起源のDNAに対して

反応する場合、各々別々の領域に適用されるシグナルDNAの量は1000〜100である。シグナルRNAをDNAの代わりにも用いてもよい。細菌やカビの孢子を直接使用してもよく、同じウィルス粒子も使用できる。

こうして作成したタグを、真偽を立証したい品物または物質に結合する。そのようなタグによって標識された品物または物質の真偽を決定するには、防護しておいた標識したプローブDNAを用いてタグを追跡・加工する。プローブDNAをタグに結合させ、各シグナルDNAのシグナル配列に結合させる。プリセットパターンに従ってハイブリダイゼーションを測定して、標識された品物または物質が本物であることを認識する。

このようにして品物または物質が本物であるという非常に高確率の信頼が達成できる。たとえば、タグがそれぞれ3つのドットのDNA6列からなり、各DNAが異なるっており、このタグを作るのに少なくとも1000個の異なるシグナル配列を与えるDNAの異なる1000個の起源が使用できると仮定しよう。1000個の異なるDNAのプールからランダムに抜き出した3つのドットのいずれかの所々の列を偽造者が独立に再生できる確率は、パターンを作るのに1000個のDNAを使用したことを偽

造のプローブをハイブリダイズさせようとして見れば容易にチェックすることができる。クロスハイブリダイズするプローブはすべて認識することができる。類似の予断を使用して、同じ種の異なる株から得たDNAに対するハイブリダイゼーションを調べることによって後に異なるプローブを得ることができ、クロスハイブリダイズしないものは所与の種の特定の株に対して特異的である。意にしたプローブを標識し、その後の使用に備えて貯蔵する。

タグを作るには、種、標識したセルロースもしくはセルロースアセテートのシート、またはHybond CもしくはHybond N (Amersham International plc) などのようなニロンベースの膜などといった適宜な支持材料上の決められた位置にシグナルDNAを配列すればよい。シグナルDNAは、微生物の細胞から分離してかまたは処理済み菌懸濁液もしくはバーストの形態で適用できる。このDNAはドット（点）またはバンド（帯）のいずれかで適用することもできる。各々のドットまたはバンドは異なる微生物から得たDNAであるか、または異なるシグナルDNAを含むものがある。DNAは、プローブDNAとハイブリダイズすることができる形態で支持材料に結合する。すなわち、DNAは通常変性しておくかまたは一本鎖にしておく。真

偽者が知っている場合で10⁵に1である。いかなる偽造でも、その人が生命体のずっと大きいサンプルから得たDNAに対する標識DNAプローブの完全な一様をもってはいない限り、いかなる方法によってもこのことを覆り始めることができないのであるから、この技術の信頼を形成するのにこの1000個のDNAを測定したかを偽造者が知ってしまうという「最悪のケース」の例でも起こらない限り、偽造者がこのパターンを再生できる確率を計算する意味の道はない。この場合ドット1000の完全なタグについて偽造者が正確な列を再生する確率は10⁵⁴に1である。明らかに、いかなる信頼性試験も、タグのマーカーに利用できるシグナルDNAの量およびタグに適用するシグナルDNAの数に応じて選択することができ、

これらの信頼は、本発明を適用し得るさらに遠いレベルにもあてはまる。これは、DNA制限酵素の多量性に基づく生体の同一性における微小な差の検出に依存する。これをいかに行なうかは我々の80-4-16/22151に開示されている。これによって、いずれかの同一性（複製）は知られている第一と第二の生体が一であるかどうかを決定するための方法が得られる。この方法は、

- (1) 第一の生体のゲノムDNAを1個以上の制限エンドヌクレアゼで消化し、

(iii) こうして得られたDNA断片を電気泳動によって分離し、
(iii') こうして分離した断片の、1種以上の第一の制限プロ
ーブとハイブリダイズする断片の位置を決定し(「ハイブリダイ
ゼーションパターン」、「バンドパターン」または「マップ」)
【このプローブまたは各々のプローブは第一または第二の生
体と同じ種の生体のゲノムDNAからランダムに選出されたDN
Aの断片を含む】、

(iv) こうして決定された断片の位置を、前記第一のプローブ
またはその各々に結合するDNA断片(これは第一の生体のゲ
ノムDNAから得られたDNA断片と同じ方法によって第二の
生体のゲノムDNAを前記の制限エンドヌクレアーゼまたはそ
の各々で消化して第二の生体のゲノムDNAから生成しかつ無
偏法態にかけおいたものである)の位置と比較する
ことからなり、

ここで、ステップ(i) から(iv)は、ステップ(iv')での比較によ
ってふたつの生体が同一でありそうであることが明らかにされ
た場合、このふたつの生体が真に異なる無関係のものとして区
別され得ないという確率(X)、すなわち

$$X = F^q \quad (1)$$

【ただし、qはステップ(iii)におけるプローブ数によって

明らかにされた位置の数であり、Fは、第一と第二の生体と異
じ種から独立に得られた生体の対のゲノムDNAを制限エンド
ヌクレアーゼ消化したものの重における、同一であるDNA断
片の割合を意味するものである】によって決定される確率(X)が
 10^{-12} 以下となるように、ステップ(iii)におけるハイブリ
ダイゼーションによって充分なバンドが得られるような量のプ
ローブDNAと1種以上の制限エンドヌクレアーゼを使用し、

(a) 前記第一と第二の生体と同じ種を代表するF種を得るのに
充分な数の、前記種から独立に得た生体のゲノムDNAを、同
じ制限エンドヌクレアーゼを使用して別々に消化し、場合によ
っては各々の消化物を別々の部分に分割し、

(b) 独立に得た生体の各々に対して消化物または消化物の一部
を、平行してゲル電気泳動にかけ、

(c) 前記種の生体のゲノムDNAからランダムに得られたDN
Aの断片からなる第二の制限プローブを用いてゲルをプローブ
検査し、

(d) こうして消化されたゲル上のハイブリダイゼーションパ
ターンを、独立に得た生体の対合組合(pairwise combinations)
に關して比較し、さらに

(e) 場合によっては、独立に得た生体の各々に対する消化物の

1つ以上の別の部分についてステップ(a) から(d) を繰返す
(ただし、前記異なる前記のDNA断片からなる前記第二の限
制プローブを用いる)

ことによって実施する。

換言すると、qは、2つの生体が同一のマップをもっている
場合、ステップ(iv)における第一と第二の生体の対合比較によ
って明らかにされたDNA消化断片の共通の位置の合計数であ
る。

ステップ(i) から(iv)は、

(i') 第一の生体のゲノムDNAと第二の生体のゲノムDNA
とを同じ制限エンドヌクレアーゼによって別々に消化し、場合
によっては各消化物をいくつかの部分に分割し、

(ii') 各生体について消化物または消化物の一部を平行してゲ
ル電気泳動にかけ、

(iii') 前記第一の制限されたプローブを用いてゲルをプローブ
検査し、こうして得られた2つの生体のハイブリダイゼーシ
ョンパターンを比較し、

(iv') 場合によって、各生体の消化物の1種以上の別の部分に
ついて、ただし各生体と異なる前記のDNA断片からなる前記
第一の制限されたプローブを用いてステップ(i') と(ii')を

繰返す

ことによって実施するのが好ましい。

ステップ(i')から(iv')の手順は、各生体と異なる制限エ
ンドヌクレアーゼを用いて二回以上実施することができる。

W0-A-86/02101の方法は、2つの生体に対するハイブリ
ダイゼーションパターンの間にある差を検出できないことがどの程
度同一性の証明と考えられるかの程度に依存する。その方法を
本発明に適用して、シグナルDNA(第一の生体)は、典型的
な場合15~250kbの長さでタグに適用(標的)する。このタグを、
真偽を立証したい品物または物質に付着(結合)させる。物品
の真偽を決定するには、たとえば電気泳動によってシグナルD
NAをタグから分離し、すでに貯蔵しておいた本物のシグナル
DNA(第二の生体)と比較する。シグナルDNAのシグナル
配列は、W0-A-86/02101に従ってハイブリダイゼーションパ
ターンを決定する際に使用するプローブとハイブリダイズする配
列である。シグナル配列はあらかじめ決定し得る。プローブは
先に標的に貯蔵しておくことができる。あるいはまたプロ
ーブは、ラベルから選定されるシグナルDNAを本物のシグナル
DNAと比較する時点で製造することもできる。

W0-A-86/02101の方法を利用することによって、あるシグナ

ルDNAが所定の箇所の特定の塩基に由来するものであることを所定の検出装置で検出することができる。このように、追加される各DNAについてそれが特定の塩基に由来するという情報を得ることができる。たとえば、 3×10^{12} に1箇所の情報量で読取って同一であるとされるような場合、箇所のタグの情報量が2つの正確なシグナルDNAを用いてタグを作成するチャンスは 9×10^{124} である。

また別の場合にはシグナル化合物がタグバク質であってよい。ここで本発明はいろいろなタンパク質のアミノ酸配列の変化とそのような配列を認識する能力によっている。たとえば抗体-抗原システムを使用してもよい。シグナル化合物が抗原として機能する場合、シグナル配列は抗体によって認識される抗原決定基である。シグナル化合物が抗体として機能する場合、シグナル配列はこの抗体の中で対応する抗原に結合する際に媒介となる配列である。抗原分子と抗体分子の双方がイムノグロブリンであるイディオタイプ-抗-イディオタイプシステムを使用してもよい。一方のイムノグロブリンが他方の抗原結合部位に結合する結合特異性を示している。

抗体-抗原システムは以下のようにして用いることができる。一度の異なるハプテンのような、変換反応しない各種の異なる

抗原で動物群を免疫して抗体を製造する。その動物から血清を収集し、個々の抗原に対して生成した抗体を精製する。次にこの抗体を、固定セルロースまたはナイロンベースの膜対たとえばHybond 0やHybond Nのような適切な基材上に固定化する。抗体を付けたパターン化された一連のポイントを読みとりにより上げ、次いでこの結合用膜の非特異的結合特異性をブロックする。この膜を乾燥し、プラスチックの下に密封し、抗体を立派したい品物または物質につなぐ。解読するには、特異的な抗原またはハプテンをタグに結合する。適切な検出系を用いて結合を検出する。

本発明によって提供される安全性は、シグナル化合物が極めて低な特定の検出系に依存する。あらかじめ決定した特定のシグナル化合物を標識に使用するが、その同一性（標識）は会合しない。どのシグナル化合物が使用されているかが肉目の検査では明らかにならないようにして品物と物質を標識する。しかし、製造業者は、製品が容易に固定されるように自分の製品を安全に標識したいならば、それが本発明によって標識されていることを会合するあるいはこの事実を隠さずにより的確な達成することができる。

前者の場合、製造業者は広告によって、本物の製品がすべて

シグナル化合物で、たとえばタグの形で標識されていることを宣言することができる。このタグは、取外しのできる留交つらべを形成していてもよい。ただしこのラベル上には、なんらかの所定の印刷した情報、とくに製造業者の個々の独特のタグに対するパッチコード番号が出現するようになっている。製品を購入した消費者はこのタグを調査分析させるために解読することができる。したがって偽って印刷されたタグは容易に固定することができる。

後者の場合製造業者はタグの存在を会合することなく製造者にそのタグを自分の製品に付ければよい。製造業者の代理人が通常の調査員を助けて小売店から製品をサンプリングすることによって、このタグの製造業者は製品の製品が出現しているか否かを発見することが可能になる。

どちらの道を採用したとしても各々のタグはユニークであり、かついろいろなシグナル化合物を有し得る。あるいは、同じシグナル化合物をもった1部のタグを使用してもよい。シグナルDNAを使用する場合、すでに記載したどちらのレベルでも動作するようにタグを設計することができる。

以下の実施例で本発明を明瞭にする。

実施例 1: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8122 (12156) の DNA に付するプラス/マイナス標識

Lactobacillus plantarum ATCC 8122 は NC-4-28/02101 に記載されている。これは、1985年 9月25日、The National Collection of Industrial (and Marine) Bacteria, Aberdeen, (英国) に委託番号 NC12 12156 として寄託されている。NC-4-28/02101 に記載されているようにして ATCC 8122 からゲノムDNAを得た。このゲノムDNAを 100° で 5 分間加熱して変性した。

Hybond C または K のタグの材料上に DNA を付着させるためにこのタグの反対側から変性 DNA の標識の試料を塗布した。タグは次いで 37°C で 30 分間乾燥した。次に、80°C で 4 時間までベーキングすることにより、またはタグを 30 分間紫外光 (304nm) に露出することにより、変性 DNA をタグに共有結合させた。いくつかのタグは、可溶性で透明な PVC (ICI plc) からサンラップ (Dow Corning) で取ることにより乾燥した。また、綿織物とナイロン織物 (シャツ) も変性 DNA で標識した。各標識に変性 DNA の濃度は 100 μg/平方センチメートルで乾燥した。5ng から 3μg の量の DNA をタグと織物に塗布した。

その後、プラスチックフィルムが付いていたタグからそのフィルムを除去した。5μg/平方センチメートルのエタラウムアロマイドの溶

液でこのタグを染色した。常例で塩析(304aa)すると紫褐色のクエイ光が観察された。これは、エチウムアロマイドがDNAに結合したことを意味している。類似のやり方でシャブの細菌物とナイロン膜物のDNAが検出されている領域をエチウムアロマイド溶液で染色した。やはりクエイ光が観察され、DNAの存在が明らかになった。

実施例 2: 図4で示すまたは類似のコピー数のシグナル配列を用いたタグの製造

1. シグナルDNAおよびプローブDNAの選別

- 1.1. 微生物のDNAを選択する。
- 1.2. 標準的な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。
- 1.3. DNAを制限酵素(たとえばS₁3A)で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースゲル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気泳動出し [McDonnell H.W. 5 (1977) J. Molac. Biol., 119, 119参照]、選したプラスミドベクター中へクローン化することができる。これらのクローンは次に、Safatos C.6 (1979) Nucleic Acids Research, 7, 1541の最適な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNA源との相関性を

試験することができる。この方法に従うと、所望のDNA源と特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。所望として、このようなプローブはLerner E.E.およびPalmer E. (1984) Cell, 37, 171-177の欠失変異技術のような富化技術を用いて固定することができ、こうすると労力が大減に軽減される。

1.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスミド調製技術を用いてシグナルDNAを大量に調製し、抽出・精製して高分子量のDNAを得る。

1.5. シグナルDNAはいずれも、所望であればButler E.T. & Chamberlain H.H. (1982) J. Biol. Chem., 257, 5772に記載しているSP系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA調製に直接することができる。この調製体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも制限酵素で切断することができる。

2. タグの製造

- 2.1. タグマトリックス上のドットの各々に対して、タグ膜上の選択された部位にそれぞれ選択した配列のシグナルDNA 5~10μ (または任意の充分量) を塗布する。DNAを固定し、これを膜たとえばHybond DまたはHybond Nに共有結合させる。

- 1.2. この膜を乾燥し、密封する。

3. タグの使用

- 3.1. 関連している物品に対して観察したタグの本質的な特徴を記録するデータバンクを参照する。タグの上に印刷されている数を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上でどのようなDNAを分布させたかを検証することができる。適切なプローブの混合物またはひとつのプローブを同時に使用して、本物のDNAが検出されているであろう印刷されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実施例 3: 選択DNAおよびコピーDNAを用いたタグの製造

1. 選択DNAの製造

- 1.1. 微生物のDNA源を選択する。
- 1.2. 生体を成長させてDNAを得る。
- 1.3. DNAを抽出し、標準的な手法によって精製して高分子量のDNAを得る。
- 1.4. DNAを制限酵素で消化して、選択したシグナルDNAの分子中に等しい平均分子量を有する分子の1個を得る。

- 1.5. 膜を乾燥し、密封する。

2. シグナルDNAの製造

- 2.1. 微生物のDNA源を選択する。これらは選択DNAの配列と同じであっても同じでなくてもよい。

- 2.2. 標準的な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。

2.3. DNAを制限酵素(たとえばS₁3A)で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースゲル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気泳動出し [McDonnell H.W. 5 (1977) J. Molac. Biol., 119, 119参照]、選したプラスミドベクター中へクローン化することができる。これらのクローンは次に、Safatos C.6 (1979) Nucleic Acids Research, 7, 1541の最適な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNA源との相関性を試験することができる。この方法に従うと、所望のDNA源と特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。所望として、このようなプローブはLerner E.E.およびPalmer E. (1984) Cell, 37, 171-177の欠失変異技術のような富化技術を用いて固定することができ、こうすると労力が大減に軽減される。

2.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスミド構築技術を用いてシグナルDNAを大量に調製する。同様の遊離DNAかまたは同様の遊離DNAに添加するのにシグナルDNAが必要なる場合、このシグナルDNAはさらに複製しなければならぬ。すなわち、適切な複製原系を用いて特異的シグナル配列を切断した後、標準的な手法により調製するプローブDNAからシグナルDNAを分離する。このような複製シグナルDNAはその決同平均分子量の調製された遊離DNAに添加できる。

2.5. シグナルDNAはいずれも、所望であればButler E.T. & Chamberlain N.H. (1982) J. Biol. Chem., 257, 5772に記載しているSPF系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA誘導体に変換することができる。この誘導体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも同様に調製で切断することができない。

3. タグの調製

3.1. シグナルDNAを遊離DNAと組合して、遊離DNAの各単位に対して40~100 コピーの個々のシグナルDNA単位を調製する。タグマトリックス上のドットの数々に対して、タグ調製の選択された部位にDNAの組合数50~1000 (または任意

の充分量)を調製する。DNAを消化し、これを調製たとえばHybond NまたはHybond Nに共有結合させる。

3.2. この調製を改良し、簡便する。

4. タグの調製

4.1. 問題にしている物品に対して調製したタグの本質的な特徴を定量的データバンクを参照する。タグの上に印刷されている値を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上にどのようにDNAを分布させたかを算出することができる。その後調製したプローブの組合数またはひとつのプローブを同時に使用して、本物のDNAが分布されているであろう選択されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実施例 4: 調製でコード数の多い同一のシグナル配列を用いたタグの調製

Lactobacillus plantarum 97161 のゲノムDNAから4種のプローブを調製した。これらのプローブは pSTL8, pSTL23, pSTL29およびpSTL30であった。これらのプローブの長さはいずれも480/52101に記載されている。そこに記載されているようにしてこれらのプローブを調製した。これらのプローブを、遊離な

「ドットプロット」法により他の記述のDNAとの類似性について試験した。特にH0-A-86/02101に記載されているようにして使用した高濃度条件下で試験した調製したものは調製したDNAとも有意にハイブリダイズしたものはなかった。これら試験した他のDNAが*Lactobacillus plantarum* C由来でないDNAとハイブリダイズすることを要する理由はない。したがって、これらの4種のプローブは所望の様に特異的なものであり、これら4種はいずれも*L. plantarum* DNAを調製するのに使用することができるであろう。さらに調製したところ、実際にはプローブpSTL29だけが*L. plantarum*のDNAと調製したハイブリダイズすることが示された。

L. plantarum 97161のゲノムDNAを、実施例1に記載されているようにしてHybond CのタグまたはHybond Nのタグに共有結合した。実施例1に記載されているプラスチックフィルムで印刷したタグを実施例1に記載されているようにして調製した。その後タグを印刷しているプラスチックフィルムを剥いて各タグの分析ができるようにした。

これらのプローブを使用して*L. plantarum*のシグナルDNAの存在を調製するために、これらのプローブを、 $[^{35}\text{S}]$ -dGTP (デオキシチジン5'- α - $[^{35}\text{S}]$ -チオトリホスフェ

ート)またはRoz2でラベルしたプローブ (Nucleic Acid Research, 12, 3435-3444, 1984)、すなわち調製の西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したプローブのどちらかで調製した。

ヒートシールしたポリエチレンバッグ (Pifco Ltd.) 中、20 μmol の消化したニシン精子DNA (Sigma Chemical Co.) を含有するプレハイブリダイゼーションバッファー (8 \times SSC; 5 \times Denhardt's 溶液 - 0.1% (w/v) ficoll-400, 0.1% (w/v) ウシ血清アルブミン, 0.1% (w/v) BSA) 中でタグを3時間調製した。新しいプレハイブリダイゼーションバッファー中85°Cでハイブリダイゼーションを完了し、標識されたDNAプローブを消化した後に洗脱温度10~400 μmol を加えた。ハイブリダイゼーション反応物を含有するシールしたポリエチレンバッグを85°Cで16時間インキュベートした。ハイブリダイゼーションの値、フィルターを85°Cの2 \times SSC 中で15分ずつ二回、85°Cの2 \times SSC, 0.1% (w/v) BSA 中で30分かけて一回、最後に85°Cの0.1 \times SSC または1 \times SSC である洗脱液溶液中で10分洗脱した。次に、Whatman 3MM クロマトグラフィーペーパーを用いてフィルターをプロット乾燥した。

H0-A-86/02101に記載されているようにしてオートラジオグラフィック、または比色計測定法 (Benz9) によって、同様の

ANSWER TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/JP 87/00342 (SA 18773)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office EDP file on 08/07/87.

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 2861866	23/01/75	None	
EP-A- 0335071	06/03/83	AU-A- 2128784	07/02/85
		JP-A- 60100055	01/05/85
US-A- 4290481	26/06/81	None	
EP-A- 0111340	20/06/84	JP-A 3112499	14/07/84
		GB-A- 1388483	13/05/85
		CA-A- 1213053	09/09/86
US-A- 3733176	15/03/77	None	
US-A- 3773200	13/12/71	US-A- 3897286	19/07/78
US-A- 4387112	07/04/81	None	
US-A- 4383965	14/11/81	None	
EP-A- 0401051	10/04/84	JP-A- 63100453	24/02/87
		EP-A- 0121678	08/07/87

FOR MORE DETAILS ABOUT THIS ANNEX, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.